

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Monika Glasnović
7039/PT

**ZELENA OTAPALA U EKSTRAKCIJAMA BIOAKTIVNIH
KOMPONENTI I ETERIČNIH ULJA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja” (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ZELENA OTAPALA U EKSTRAKCIJAMA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI I ETERIČNIH ULJA

Monika Glasnović, 0058206258

Sažetak: S ciljem očuvanja okoliša, znanstvenici se okreću otkrivanju novih metoda koje su u skladu s principima zelene kemije. Dio problema čine industrije koje provode razne ekstrakcije i pritom stvaraju velike otpadne količine organskih otapala koja su štetna za prirodu. Upravo zbog toga, danas se istražuju metode koje koriste zelena otapala poput vode i etanola, te netoplinke metode koje nastoje skratiti vrijeme ekstrakcije. U ovom radu istražen je učinak visokonaponskog pražnjenja na ekstrakciju fenolnih spojeva iz majčine dušice uz alternativna otapala vodu i etanol. Najveći prinos ekstrakcije postignut je upotrebom 50% vodene otopine etanola, napona 30kV i frekvencije 150Hz. U većem broju eksperimenata voda se pokazala kao prikladnije otapalo s većim prinosom koncentracije fenolnih spojeva.

Ključne riječi: ekstrakcija, etanol, fenolni spojevi, visokonaponsko pražnjenje, voda

Rad sadrži: 31 stranicu, 13 slika, 7 tablica, 25 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak*

Pomoć pri izradi: *doc. dr. sc. Tomislava Vukušić*

Datum obrane: 9. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

GREEN SOLVENTS IN EXTRACTIONS OF BIOCHEMICAL COMPONENTS AND ESSENTIAL OILS

Monika Glasnović, 0058206258

Abstract: With the goal of preservation of environment, scientists are turning around and trying to find new methods that are within the principles of the green chemistry. Part of the problem are industries that conduct various extractions while producing large amounts of organic solvents as waste. Nowadays, methods which use green solvents such as water and ethanol are explored, and non-thermic methods that try to shorten the time of extraction. In this paper, the effect of high-voltage discharges during extraction of phenolic compounds with alternative solvents such as water and ethanol is explored. The biggest yield is accomplished with use of 50% aqueous ethanol solution, voltage of 30kV and frequency of 150Hz. In most experiments, water has been proved as more appropriate solvent with higher yield of concentration of phenolic compounds.

Keywords: extraction, ethanol, high-voltage discharge, phenolic compounds, water

Thesis contains: 31 pages, 13 figures, 7 tables, 25 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak*

Technical support and assistance: *doc. dr. sc. Tomislava Vukušić*

Defence date: July 9th 2018

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja” (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Zelena kemija	2
2.2. Zelena ekstrakcija.....	4
2.3. Zelena otapala	7
2.3.1. Ionske kapljevine	9
2.3.2. Eutektička otapala	11
2.4. Biljke za ekstrakciju	13
2.5. Ekstraktor	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Uzorci.....	16
3.1.2. Reagensi.....	16
3.1.3. Uređaji i pribor	16
3.2. Metode rada	17
3.2.1. Ekstrakcija	17
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola.....	17
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti	19
3.2.4. Određivanje elektroprovodljivosti	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČCI.....	29
6. LITERATURA	30

1. UVOD

Porastom ljudske populacije, industrijska proizvodnja brzo se razvija i povećava te sa sobom donosi razna zagađenja okoliša i vrlo pretjeranu eksploataciju prirodnih resursa. Takav sustav nije održiv i zbog toga se nastoje pronaći alternativni putevi i rješenja. Rješenje održivog razvoja je u zelenoj kemiji (Kudlak i sur. 2015). Njen cilj je proizvesti i osmisliti procese i proizvode kojima bi se smanjila upotreba supstanci štetnih za zdravlje ljudi i okoliša, uz istovremeno povećavanje iskorištenja procesa (Kudlak i sur. 2015; Chemat i sur., 2012).

Jedno od bitnijih polja zelene kemije je zelena ekstrakcija (Chemati sur., 2012). Njezin cilj je zamjeniti tradicionalne postupke ekstrakcija alternativnim postupcima kojima se postiže optimalna potrošnja sirovina, otapala i energije. Također, jedan od zadataka zelene ekstrakcije je pronaći nove izvore obnovljivih biljnih materijala te brinuti otpad industrije. Danas gotovo da ne postoji proizvodni proces u raznim industrijama koji ne uključuje jednu od vrsta ekstrakcije prirodnih produkata (Chemat i sur., 2012). Konvencionalni načini ekstrakcije koriste hlapiva organska otapala u iznimno velikim količinama koja isparavaju u zemljinu atmosferu i stvaraju efekt staklenika, troše puno energije zbog procesa koji su vremenski dugotrajni i često se provode pri povišenoj temperaturi, te ne ostvaruju potpuna iskorištenja procesa (Chemat i sur., 2012). Procjenjuje se da otapala koja se koriste tijekom ovakvih procesa ekstrakcije čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih hlapljivih organskih emisija tvari u cijelom svijetu (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Stoga se organska otapala nastoje zamjeniti zelenima otapalima. Danas, velika je pažnja usmjerena u nove vrste otapala kao što su ionske kapljevine i eutektičke tekućine koje bi svojim svojstvima mogle biti dobra zamjena konvencionalnim otapalima.

Cilj ovog rada je utvrditi učinkovitost korištenja odabranih "zelenih" otapala te njihovu optimalnost u ekstrakciji bioaktivnih komponenti i eteričnih ulja timijana, kadulje, ružmarina, mravinca, lista masline i majčine dušice.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Zelena kemija

Zelena kemija je definirana kao osmišljavanje kemijskih produkata i procesa na način da reduciraju ili eliminiraju upotrebu i generacija opasnih supstanci. Ova definicija i koncept zelene kemije je prvi puta spomenut na početku devedesitih godina dvadesetog stoljeća, i od tada ima veliki utjecaj na industriju te poprima sve veću važnost. Karakterizira ju pomno planiranje kemijskih sinteza kako bi se smanjile potencijalno štetne posljedice. Cilj je proizvesti proizvode i procese koji su profitabilni, a svojim svojstvima ne škode ljudskom zdravlju niti okolišu. Znanstvenici Paul Anastas i John Warner su 1998. godine osmislili dvanaest načela zelene kemije koja su dizajnirana kao pomoć kemičarima za postizanje cilja održivosti (tablica 1). Prema tim načelima, vode se nove ideje o smanjenoj ili nikakvoj upotrebi supstanci štetnih za zdravlje ili okoliš, bez smanjenog učinka samog procesa te profitabilnosti. Osmišljeni okvir dvanaest načela zelene kemije je predložak za mnoge napretke na terenu, međutim, dvanaest načela nisu trebala biti dvanaest neovisnih ciljeva, već integrirani kohezivni sustav dizajna. Jedino kroz primjenu svih načela nadamo se postizanju istinski održivog procesa. Tražeći međusobno ojačavajuće aspekte načela, sustavni održivi dizajn je moguć i može olakšati transformaciju umjesto inkrementalnog poboljšanja (Anastas i Eghbali, 2010).

Tablica 1. 12 načela zelene kemije (Anastas i Warner, 1998)

BROJ NAČELO

1	Bolje je spriječiti nastajanje otpada nego ga tretirati ili uništiti nakon što je nastao.
2	Sintetičke metode bi trebale biti osmišljene tako da se maksimalno iskoriste sve ulazne sirovine u konačnom proizvodu.
3	Kada je moguće, sintetičke metode trebale bi biti osmišljene da koriste i generiraju supstancije koje su malo ili ne toksične ljudskom zdravlju i okolišu.
4	Kemijske proizvode potrebno je osmisliti tako da im se održi djelotvornost, a smanji toksičnost.
5	Uporabu pomoćnih tvari poput otapala i separativnih tvari, treba izbjeći kada je moguće.
6	Potrebno je poznavati učinak na okoliš te ekonomski učinak energetske zahtjeva kemijskih procesa. Energetski zahtjevi trebaju biti svedeni na minimum tako da se kad god je moguće provode na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku.
7	Treba koristiti obnovljive sirovine i materijale kada je to tehnički i ekonomski izvedivo.
8	Nepotrebna proširenja procesa kao što su zaštita funkcionalnih skupina i privremene modifikacije fizikalno-kemijskih procesa, potrebno je zaobići kada je moguće, jer takvi postupci zahtijevaju dodatne reagensne i mogu generirati otpad.
9	Katalitički reagensi, selektivni koliko je moguće, prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama.
10	Kemijski proizvodi trebaju biti osmišljeni tako da na kraju njihove funkcije oni se raspadnu na neškodljive degradacijske proizvode, i da ne štete okolišu.
11	Analitičke metodologije trebaju biti daljnje razvijene kako bi dozvolile nadgledanje procesa u stvarnom vremenu te kontolu prije nastanka opasnih supstanci.
12	Supstance korištene u kemijskim procesima treba odabrati tako da se minimizira potencijalna opasnost od kemijskih nesreća, uključujući eksplozije, požare te štetna isparavanja.

2.2. Zelena ekstrakcija

Ekstrakcija je ravnotežno odvajanje jedne ili više komponenti iz početnog sustava koji može biti kruta ili kapljevita faza, pomoću otapala. U otapalo difundiraju tvari koje su topive u tom otapalu, a ostale zaostaju u ishodišnoj smjesi. Dobiva se ekstrakt koji sadrži tvar za čije se razdvajanje mora provesti postupak pročišćavanja. Pojam zelene ekstrakcije pojavio se kao jedna od ideje zelene kemije, te je generalna definicija zelene ekstrakcije da se ona temelji na otkrivanju i dizajnu ekstrakcijskih procesa koji će reducirati uporabu energije, dozvoliti korištenje alternativnih otapala i obnovljive prirodne produkte, i osigurati siguran i visoko kvalitetan produkt ili ekstrakt (Chemat i sur., 2012). Primjeri konvencionalnih ekstrakcija poput destilacije vodenom parom troše velike količine energije, a ekstrakcije otapalima većinom koriste organska otapala koje stvaraju velike količine otpadne tekućine koja je štetna za okoliš te su dugotrajne.

Identificirana su tri glavna rješenja prema kojima se dizajniraju i demonstriraju zelena otapala u laboratorijima ili industrijskim razmjerima za pristup optimalnoj potrošnji sirovih materijala, otapala i energije, i to su:

1. poboljšanje i optimizacija postojećih procesa,
2. korištenje nenamjenske opreme i
3. inovacija procesa i procedura te otkrivanje alternativnih otapala.

Postavljeno je šest principa zelene ekstrakcije prirodnih produkata, te znanstvenici i industrija bi ih trebali gledati kao upute u uspostavljanju inovativnih zelenih ekstrakcija (tablica 2), te su opisane ne kao pravila, već više kao inovativne smjernice za pratiti, koje su otkrivene od strane znanstvenika i uspješno primjenjivani u industriji. Opisuju višenamjensku strategiju primjene ovog koncepta na istraživačkoj i industrijskoj razini. Osnove ovog radnog protokola su nova i inovativna tehnologija, intenziviranje procesa, agro-otapala i ušteda energije. Raspravlja se o konceptu, načelima i primjerima zelene ekstrakcije, nudeći ažuriran pogled na ogroman tehnološki napor koji se stvara i raznolike aplikacije koje se razvijaju (Chemat i sur., 2012).

Tablica 2. Principi zelene ekstrakcije (Chemat i sur., 2012)

BROJ	PRINCIP
1	Inovacije od selekcija varijeteta obnovljivih biljnih izvora.
2	Korištenje alternativnih otapala i uglavnom vodenih ili agro-otapala.
3	Redukcija potrošnje energije kroz rekuperaciju energije i upotrebu inovativnih tehnologija.
4	Proizvodnja nusprodukta, umjesto otpada, kako bi se uključile druge industrije.
5	Smanjiti rad pogona i koristiti sigurne i kontrolirane procese.
6	Ciljati na ne-denaturirane i biorazdradive ekstrakte bez kontaminanata.

Na ekstrakciju posebno utječu ekološki i ekonomski čimbenici koji zahtijevaju masivno smanjenje potrošnje energije i proizvedenog otpada. Postoje četiri načina za smanjenje potrošnje energije: optimiziranje postojećih procesa, rekuperacija energije oslobođene tijekom procesa ekstrakcije, pomaganje postojećim procesima intenziviranjem i potpuna inovacija procesa.

Primjeri smanjene potrošnje energije ponovnom uporabom energije i primjene inovativnih tehnologija su aktivacija mikrovalovima i/ili ultrazvukom, primjena alternativnih otapala kao što su super i superkritični fluidi (CO₂ i voda), ionske kapljevine i eutektička otapala. U sljedećim odlomcima je pobliže objašnjena ekstrakcija primjenom mikrovalova, ultrazvuka te visokonaponskog pražnjenja.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalna ekstrakcija je jedna od inovacija zelenih ekstrakcija te predstavlja novu tehniku procesiranja materijala. Mikrovalovi su elektromagnetski valovi građeni od dva oscilirajuća polja: električno i magnetno polje. Energija mikrovalova je neionizirajuće zračenje frekvencije između 300 MHz i 300 GHz, te valne duljine od 1mm do 1m. Dijeluju tako da zagrijevaju cijeli volumen uzorka odjednom te oštećuju vodikove veze, potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava prodiranje otapala u materijal te se na taj način potiče otapanje (Wong i Weller, 2006). Temelj zagrijavanja pomoću mikrovalova je njihovo direktno djelovanje na molekule ciljanog materijala.

Danas se, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, najčešće koristi za ekstrakciju prirodnih komponenti iz biljnog materijala zbog značajne redukcije vremena samog postupka, i uporabe otapala, te dokazane efikasnosti. Tijekom ekstrakcije, zračenje mikrovalova služi za zagrijavanje otapala s uzorkom zbog unaprijeđenja postupka ekstrakcije. Zračenjem mikrovalova tijekom ekstrakcije uglavnom se postiže povećanje ekstrakcije sekundarnih biljnih metabolita, poput polifenola, te tvari arome (Blekić i sur., 2011).

Kada je uzorak podvrgnut zagrijavanju, u njemu se zagrijava vode zbog čega dolazi od oslobađanja vodene pare u stanicama što rezultira puknućem staničnih membrana. Difuzija sekundarnih metabolita se pospješuje i oni difundiraju u otapalo. (Starmans i sur.,1996) Efikasnost samog procesa najviše ovisi o prirodi otapala i matriksu uzorka, te sam odabir otapala i parametara procesa ovisi o komponentama prisutnim u pojedinom uzorku. Parametri koji utječu na sam proces ekstrakcije su temperatura, vrijeme ekstrakcije, primjenjeni tlak, snaga mikrovalova, odabrano otapalo te svojstva matriksa uzorka (Destandau i sur., 2013).

Ekstrakcija ultrazvukom

Proces ekstrakcije ultrazvukom temelji se na korištenju ultravučnih valova, valova frekvencije iznad 20 kHz. Korištenje ultrazvuka može poboljšati proces ekstrakcije povećanjem prijenosa mase između otapala i biljnog materijala. Ultrazvučni valovi uzrokuju nastajanje sitnih mjehurića koji pri dovoljno snažnim vibracijama, kada su amplitude nastalog tlaka veće od hidrostatskog, tada dolazi implozije mjehurića i pojave kavitacije. Implozijom nastaju ekstremno veliki uvjeti, temperature visoke nekoliko do tisuća kelvina i tlakovi od nekoliko stotina atmosfera (Lovrić, 2003.).

Osim toga, kolaps kavitacijskih mjehurića vodi boljem staničnom remećenju putem formiranja mikročestica zbog asimetričnog kolapsa mjehura u blizini čvrste površine. To omogućuje poboljšano prodiranje otapala u sam biljni materijal, i može također razbiti stanične stijenke. Kao posljedica toga, korištenje ultrazvuka u provođenju ekstrakcija biljaka ima brojne prednosti poput povećanog prijenosa mase, bolje prodiranje otapala, manje ovisnosti o korištenim otapalima, ekstrakcija se može provoditi pri nižim temperaturama, vrijeme trajanja procesa ekstrakcije se smanjuje, te postižu se veći prinosi željenih komponenti u ekstraktu. Ove značajke čine ultrazvučnu ekstrakciju vrlo poželjnom tehnikom za mnoge ekstrakcije (Mason i Vinatoru, 2011).

Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem

Zadnjih dvadeset godina se sve više istražuju električna pražnjenja u vodi. Provode električna pražnjenja u tekućinama i plinovima. Molekule u tekućini imaju mnogo veći ionizacijski potencijal što znači da je potrebno puno više energije da im se ukloni elektron. Sam mehanizam nastajanja plazme u tekućini nije još u potpunosti razjašnjen (Gasanova, 2013). Pulsirajuće električno polje koje se koristi za nastajanje plazme dovodi do stvaranja pora u membrani stanice, tj. elektroporacije. Kao posljedica polarizacije iona u membrani dolazi do njene kompresije i naposljetku pucanja (Fincan i sur., 2004). Električni izboji stvaraju šok valove, a u tekućini mogu izazvati kavitaciju. Produkti djelovanja plazme u vodi su hidroksilni radikal i vodikov peroksid koji su visoko reaktivni spojevi (Boussetta i Vorobiev, 2014). Na osobine pražnjenja utječu oblik i raspored elektroda, razmak među njima te hrapavost površine elektroda (Sugiarto i Sato, 2001).

2.3. Zelena otapala

Zelena otapala su možda najaktivnije područje istraživanja u sklopu zelene kemije. Otapala predstavljaju izazov za zelenu kemiju jer često čine veliku količinu otpada u sintezama i procesima jer se koriste svakodnevno i u velikim količinama. Štoviše, većina konvencionalnih otapala je toksična, zapaljive i nagrizaјуća. Njihova topljivost i hlapivost su doprinjele poluciji zraka, vode i zemlje, i zato se nastoje zamjeniti zelenim otapalima. Organska otapala predstavljaju opasnost za dobrobit okoliša zbog čega su brojna istraživanja upravo posvećena otkrivanju zelenih otapala, te zamjenom konvencionalnih organskih otapala zelenima koja su ekološki prihvatljivija jer svojim raspadom na pojedine komponente ni na koji način ne štete prirodi (Anastas i Eghbali, 2010). Oni čine obnovljive izvore proizvedene od biomasa poput drva, ulja voća i povrća. Imaju veliku moć otapanja, biorazgradiva su, netoksična i nezapaljiva. Njihove limitacije vezane su za cijenu, viskoznost i temperature vrenja. Idealna zelena otapala moraju zadovoljavati sljedeće kriterije: moraju biti sigurni za zdravlje ljudi, smanjiti opasnost, lako razgradiva te pružiti visoki prinos produkta (Chemat i sur., 2012). Vrste zelenih otapala koja se najčešće koriste opisane su u sljedećim odlomcima.

Voda je molekula koje na planetu najviše ima u izobilju i nekad za nju kaže da je benigno, univerzalno otapalo i zato je biti u mogućnosti provoditi reakcije u ili na vodi velika

prednost. Voda je sigurna i ne predstavlja nikakvu opasnost. Može biti korištena kao korisno otapalo na velikoj skali raznih procesa u kemiji. Svojstva vode su vodila poboljšanju brzina reakcija kroz hidrofobni efekt i lakšu separaciju jer se velika količina organskih tvari ne otapa u vodi. Jedina mana koja bi mogla usporiti industrijsku primjenu je kontaminacija vode za koju bi se trebalo utrošiti velika količina energije za njeno pročišćavanje (Anastas i Eghbali, 2010).

Primjenjuje se za ekstrakciju polarnih spojeva kao proteini, ugljikohidrati i organske kiseline. Najviše obećavajuće tehnike zelene ekstrakcije vodom su ekstrakcija vrućom vodom pod visokim tlakom te upotreba superkritične vode, pogotovo zato što utječu na brzinu ekstrakcije. Vrlo je značajna karakteristika lagana manipulacija dielektrične konstante vode, koja može varirati u širokom rasponu što se postiže mijenjanjem temperature i tlaka. Pri sobnoj temperaturi, voda ima dielektričnu konstantu od oko 80, što je čini jako polarnim otapalom te zbog toga u njoj su slabo topljive organske tvari. Topljivost organskih tvari se može povećati promjenom i postavkom parametara vode na određene vrijednosti. Povišenjem temperature i tlakova snizuje se dielektrična konstanta, što povećava difuziju vode. Potrebno je pripaziti na parametre primjenjene temperature i tlakove kako bi se ne bi trošilo puno energije, te ostalo u okvirima zelene kemije (Chemat i sur., 2012, Chemat i sur. 2016).

Etanol je najčešće zeleno otapalo koje se dobije fermentacijom biljnih materijala bogatih šećerom poput šećerne repice ili žitarica. Iako je zapaljiv i potencijalno eksplozivan, koristi se u velikoj mjeri jer je lako dostupan i visoke čistoće, jeftin je i potpuno biorazgradiv. Dobro ekstrahira polarne komponente iz prethodno pripremljenog biljnog materijala (Chemat i sur., 2012).

Superkritični fluidi također predstavljaju alternativu tradicionalnim organskim otapalima i opsežno su proučavani u proteklom desetljećima. Oni su tvari koje su istovremeno zagrijane i komprimirane iznad njihovih kritičnih točaka. Najčešće su superkritični fluidi generirani iz vode i ugljičnog dioksida, iako ugljični dioksid ima najširu upotrebu (Anastas i Eghbali, 2010).

Dokazano je svestrano otapalo, sigurno te se njime lako rukuje, što je pokazano djelima brojnih istraživanja. Ono što superkritične fluide čini privlačnim, i osobito superkritični ugljikov dioksid, je promjena stanja koja se javlja kada hlađenjem posude ili smanjenjem tlaka. Iznadkritične točke, ugljikov dioksid će biti tekućina u kojoj mogu biti reakcije izvedene i ispod, te će biti plin. Otplinjavanje sustava omogućava potpuno uklanjanje otapala.

Pronašao je širok raspon industrijskih aplikacija s najpoznatijom kao dekafeincija zelenih zrna kave, i zamjena perkloretilena u suhom čišćenju. Superkritične tekućine pokazale su se kao jedna vrijedna alternativa do tradicionalnih otapala (Anastas i Eghbali, 2010). Tehnika ekstrakcije sa superkritičnim CO₂ koristi se kao komprimirani plin pod tlakom do 300 MPa pri umjerenoj temperaturi od 30 do 40 ° C, kako bi se zamijenila organska otapala kao što je heksan. Koristi se za slabo polarne spojeve male molekularne mase kao što su karotenoidi, trigliceridi, masne kiseline, arome. Glavni nedostaci ostaju njegova visoka početna cijena ulaganja i teškoće za kontinuirane ekstrakcije (Chemat i sur., 2012).

Metilni esteri masnih kiselina biljnih ulja također mogu zamijeniti petrokemijska otapala. Osim što su biorazgradivi i netoksični, metilni esteri masnih kiselina ne emitiraju hlapive organske spojeve, imaju tehničke rezultate usporedive s onima petrokemijskih otapala. Glicerol, nusproizvod iz trans-esterifikacije biljnih ulja, vrlo je čest u kozmetičkoj industriji kao otapalo za maceraciju bilja i začina (Anastas i Eghbali, 2010).

Terpeni su prirodna otapala koja postoje i u agrumima i mnogim drugim biljkama, s izvanrednim tehničkim i kemijskim svojstvima. Uključuju ugljikovodike s C₅H₈ izoprenskim jedinicama te se mogu dobiti uglavnom iz esencijalnih ulja, smola i drugih aromatičnih proizvoda od povrća. Manje su zapaljivi od klasičnih organskih otapala, a manje su im to što imaju veću viskoznost, gustoću i višu temperaturu vrelišta. Poznati terpeni koji se koriste kao otapala su d-limonen, p-cimen i β-mircen. d-Limonen dobiva se iz kore agruma. Rastući interes za limonen se pojavio jer su prepoznate njegove kvalitete odmašćivača. Nedavno je, kao alternativa ekstrakciji organskim otapalom, ispitana ekstrakcija ulja s d-limonenom. Prinos i kvaliteta dobivenog sirovog ulja bile su gotovo slične onima dobivenim pomoću n-heksana. p-Cimen je aromatski ugljikovodik koji se javlja u uljima listovima drveća. α-Pinen je prirodni terpen - ugljikovodik dobiven iz smole turpentina, vrsta eteričnog ulja dobivenog destilacijom borove smole (Tanzi i sur., 2012).

2.3.1. Ionske kapljevine

Kao što ističe njihovo ime, ionske tekućine, ili ponekad nazvane ionske tekućine sobne temperature, su tekuće otopine soli na sobnoj temperaturi (Anastas i Eghbali, 2010). Njihova je specifičnost što nisu građene od molekula, već od aniona i kationa, to jest njihovih slabo koordinirajućih otopina. Po definiciji, točka taljenja mora biti ispod 100 °C. U njima, kationi najčešće dolaze iz velikih organskih molekula male simetrije različito supstituiranih

koji sadrže pozitivno nabijen dušikov, sumporov ili fosforov atom kao što su N, N'-dialkilimidazolijev, N-alkilpiridinijev, N-alkilmorfolinijev, N-alikilpikolinijev, N, N'-dialkilpirazolijev, alkilamonijev, alkil. Tipični anioni su anioni halogenidi, tetrafluorborat, heksafluorofosfat- , nitrat, sulfat, bis[(trifluormetil)- sulfonil]imid, acetat, dicijanamid, alkilsulfati, alkilsulfonati, p-toluensulfonat i trifluoracetat (Cvjetko Bubalo i sur., 2014, Janiak, 2013).

Povoljna svojstva ionskih tekućina uključuju izuzetno male količine isparavanja, niska točka vrelišta, kemijska i termička stabilnost, nezapaljivost, visoka ionska provodnost, veliki toplinski kapacitet, velika toplinska provodnost, širok potencijal elektrokemijskog prostora. Još važnije, njihova fizikalna i kemijska svojstva, kao što su hidrofobnost, polaritet i mješljivost, mogu se jako dobro prilagoditi za niz primjena kroz različite strukture kationa ili aniona i njihovih kombinacija (Zhao, 2006). Izabrana svojstva ionskih tekućina prikazana su u tablici 3. (Kudlak i sur., 2015).

Tablica 3. Izabrana svojstva ionskih tekućina (Kudlak i sur., 2015)

Parametar	Opis
Tlak pare	Pri standardnim uvjetima, ionske tekućine imaju vrlo nizak tlak pare zbog čega imaju visoku točku vrelišta, što ih jako razlikuje od klasičnih organskih otapala. Nizak tlak pare znači da otopine ne hlape i ne emitiraju štetne tvari u atmosferu.
Topljivost i mješanje	Ionske kapljevine pokazuju visoku mogućnost stvaranja di- i polifaznih sustava što olakšava njihovu naknadnu izolaciju iz reakcijskog sustava. Velika prednost je i mogućnost otapanja organskih i anorganskih komponenti. Glavni faktor koji utječe na ove parametre je vrsta vezanog aniona, a drugi je duljina alkilnog lanca kationa.
Kiselost i lužnatost	Ionske kapljevine pokazuju svojstva kiselina i lužina, mogu biti proton donori i proton akceptori. I u ovom slučaju, navedeni parametri ovise o kombinaciji aniona i kationa.
Termostabilnost	Ovo svojstvo vrlo je važna karakteristika ionskih kapljevina. U usporedbi s klasičnim organskim otapalima, one su više stabilne i manje sklone otapanju pri visokim temperaturama. Anion i kation imaju utjecaj na termostabilnost. Neke široko primjenjivane ionske kapljevine su stabilne na čak i 400 °C.

Sama priprava ionskih kapljevina najčešće se odvija u dva koraka: priprava željenog kationa reakcijom kvaternizacije tercijarnog amina odgovarajućim alkilirajućim reagensom te izmjena aniona solima ili kiselinama koje sadrže željeni anion (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

2.3.2. Eutektička otapala

Eutektička otapala su nova generacija otapala proizašla iz ionskih kapljevina te danas prolaze brojna ispitivanja smjesa ionskih kapljevina i nenabijenog donora vodika, a pripadaju skupini spojeva koji se nazivaju jaka eutektička otapala, poput smjese kolin-klorida i uree (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Posljednjih je godina sporno pripadaju li eutektička otapala ionskim kapljevinama, jer osim iona, oni uključuju neutralne molekule. Eutektičko otapalo sastoji se od nekoliko, obično dva ili tri sastojaka. Specifičnost eutektičkih otapala je ta da sastojci stvaraju eutektičnu smjesu temperature taljenja nižu od temperature taljenja svakog pojedinog od tih sastojaka, što je rezultat stvaranja intermolekularne vodikove veze. Primjer jednostavne eutektičke smjese je kombinacija dvaju krutih tvari: urea ($T_t = 133\text{ }^{\circ}\text{C}$) i kolin klorid ($T_t = 302\text{ }^{\circ}\text{C}$) u molarnom omjeru od 2:1.

Kao rezultat toga, dobiva se tekuća smjesa temperatura taljenja od $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kolin klorid je kvaterna amonijeva sol, sigurna, jeftina i niske toksičnosti. To je široko korištena komponenta eutektičnih otapala, te se obično kombinira sa spojevima sposobnim za stvaranje vodikove veze poput amida, kiselina i alkohola (Kudlak i sur., 2015). Najčešća eutektička otapala temelje se na kolin kloridu, karboksilnim kiselinama i drugim donorima vodikovih veza, poput uree, limunske kiseline, sukcinjske kiseline i glicerola. Imaju slične karakteristike kao ionske kapljevine, ali su jeftinija za proizvodnju (niža cijena sirovine), manje su toksični i često biorazgradivi (Kudlak i sur., 2015).

Dai i suradnici su istraživali veliki broj stabilnih prirodnih eutektičkih otapala na temelju prirodnih spojeva, naročito primarnih metabolita kao što su organske kiseline, aminokiseline i šećeri (Paiva i sur., 2014). U zadnje vrijeme su prirodni spojevi poput aminokiselina, organskih kiselina, šećera, kolina i uree privlače veliki interes. Oni čine vrlo raznovrsnu skupinu tvari za proizvodnju novih ionskih i eutektičkih tekućina. Vrlo su obećavajući jer su, osim njihove velike kemijske raznolikosti, lako biorazgradivi i njihova niska toksičnost dopušta primjenu u farmaceutskoj industriji. Tipovi eutektičkih otapala prikazani su u tablici 4 (Paiva i sur., 2014).

Tablica 4. Tipovi eutektičkih otapala (Kudlak i sur., 2015)

Tipovi	Sastav	Primjer
Tip I	Kombinacija metalne soli i organske soli	ZnCl_2 + kolin klorid
Tip II	Kombinacija hidrata metalne soli i organske soli	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + kolin klorid
Tip III	Komponenta koja je donor vodika u kombinaciji s organskom soli	kolin klorid + urea
Tip IV	Kombinacija metalnog klorida s komponentom koja je donor vodikove veze	MCl_x + urea / ethilen-glikol / acetamid

Učinkovitost ekstrakcijskog sredstva je ovisna o svojstvima otapanja. Eutektičke otopine imaju sposobnost donaciranja i prihvatanja protona i elektrona, što im daje sposobnost stvaranja vodikovih veza te se time povećava njihova sposobnost otapanja. Dai i suradnici su prometrili ekstrakciju fenolnih spojeva šafranike, koristeći različita prirodna eutektička otapala, mliječnu kiselinu, glukozu, glukozu-kolin klorid i fruktozu-glukoza-saharoza. U tom radu utvrđeno je da prirodna eutektička otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva, koji su povezani interakcijama vodikovih veza koje su uspostavljene između fenolnih spojeva i molekula prirodnih eutektičkih otapala. Njihova fizička svojstva također imaju veliki utjecaj na ekstrakciju, kao što su polaritet i viskoznost. Optimiziranjem svih parametara (viskoznost, polaritet i temperatura), ovi su autori zabilježili veći prinos ekstrakcije fenolnih spojeva korištenjem prirodnih eutektičkih otapala u usporedbi s uobičajenim otapalima kao što su voda i etanol. Topivost slabo topljivih molekula kao što je benzojeva kiselina, grizeo-fulvin, danazol i itakonazol, prijavljena je 5 do 22.000 puta više u eutektičkim otapalima nego u vodi. To potvrđuje njihovu primjenjivost kao ekstrakcijskih agensa bioaktivnih molekula. Štoviše, također mogu otopiti više-ionske prijelazne metalne okside iz minerala (Paiva i sur., 2014).

U većini slučajeva gustoća je veća od one u vodi. Uglavnom eutektička otapala imaju veću gustoću od gustoće tvari koja je davatelj vodikove veze. Eutektične smjese imaju veću

gustoću koja može biti rezultat pojave jakih vodikovih veza između molekula. Van der Waalove interakcije i elektrostatske interakcija imaju velik utjecaj na gustoću. To ovisi uglavnom o postotku vode i temperature. Eutektičke smjese na osnovi organskih kiselina su najpolarnije; druge su smjese na osnovi aminokiselina. Smjese na osnovi šećera i poliakohola su najmanje polarni. Vodljivost je strogo povezana s viskoznošću zadanog sustava i povećava se s povećanjem sadržaja soli u sustavu. Većina eutektičkih smjesa mogu se usporediti s ionskim tekućinama u tom pogledu. Fizikalno-kemijska svojstva uvelike ovise o strukturi dane tekućine. Većina ih pokazuje održivost na visokim temperaturama (preko 200 ° C), osim onih koji sadrže šećernu komponentu (Paiva i sur., 2014).

2.4. Biljke za ekstrakciju

Biljni materijali koji će se koristiti u eksperimentalnom dijelu projekta "*Greenvoltex*" opisani su u sljedećim odlomcima, te prikazani na slici 1.

Kadulja (*Salvia officinalis*) je biljka iz porodice usnača. Kadulja je višegodišnja biljka, račvastog, drvenastog korijena koji duboko prodire u tlo. Vrlo je otporna na sušu. Eterično ulje se nalazi u cijelom nadzemnom dijelu biljke, a najviše u listovima. U osušenoj biljci ga ima od 1,6 - 2,7%. Od aktivnih tvari, kadulja najviše sadrži monoterpenskih ketona - α i β tujon u omjeru 5 : 1 u količini od 60 %, 1,8-cineol, tanine, ružmarinsku kiselinu i karnozol. Najcijenjenija je dalmatinska kadulja jer sadrži najviše tujona (Dragović-Uzelac, 2017).

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) je također biljka iz porodice usnača. Višegodišnji je mali grm visine 20 - 40 cm, i ima četverobridnu stabljiku koja je u donjem dijelu drvenasta. Koristi se nadzemni dio biljke u cvatnji. Prosječno list sadrži 1 - 2,5% eteričnog ulja koje čine sljedeće komponente: timol (30 – 70%), karvakrol (3 – 5%), triterpenske kiseline, klorogenska -, kava – i ružmarinska kiselina te flavoni luteolin i njegovi derivati (Dragović-Uzelac, 2017).

Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) još je jedna biljka porodice usnača. Biljka izgleda kao grm visine do 30 cm s malim listićima i cvijetovima svijetloružičaste do purpurne boje. Eteričnog ulja ima vrlo malo u količinama 0,1 – 0,6%. Ono sadrži fenolske monoterpene timol (1 – 4%) i karvakrol (5 – 33%). Neki kemotipovi sadrže citral, 1,8-cineol, linalol, linalilacetat, borneol i geraniol. p-Cimen-osnovni je sastojak ulja srednjoeuropskih podvrsta (50%), rijede citral i pinen (Dragović-Uzelac, 2017).

Ružmarin (*Rosmarinus Officinalis*) je biljka sredozemnog podneblja iz porodice usnača. Ružmarin je zimzelena grmolika biljka igličastih listova i krhkih svjetloplavih cvjetova. Za ekstrakciju bioaktivnih komponenti koriste se igličasti listovi. Eterično ulje ružmarina u najvećoj mjeri sadrži 1,8-cineol, α -pinen, kamfor, kamfen, borneol, bornil acetat i kariofilen (Fu i sur., 2007).

Mravinac (*Origanum vulgare*) naziva se još i divlji mažuran ili origano te je samonikla biljka mediteranskog podneblja iz porodice usnača. Višegodišnja je biljka koja raste do visine od 60 cm. Stabljika ima male tamnozeleno listiće koji su na vrhu zašiljeni. Nekoliko nehlapivih spojeva kao što su karnosol, kvercetin, kafeinska kiselina i ružmarinska kiselina, koji čine glavnu eteričnog ulja mravinca, poznati se kao dobri sakupljači slobodnih radikala, ali neki hlapivi spojevi iz eteričnih ulja posjeduju i potencijal kao prirodna sredstva za očuvanje hrane (Kulišić i sur., 2004).

Listovi masline (*Olea europea*) smatraju se jeftinom sirovinom koja može poslužiti kao izvor visokovrijednih bioaktivnih spojeva poput polifenola, s potencijalnom primjenom u medicini, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Fenolne komponente listova maslina posjeduju antioksidacijsku aktivnost kao i antimikrobnu protiv *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* i *Staphylococcus aureus*. Od komponenti, ekstrakt u značajnijim količinama sadrži oleuropein i polifenole poput hidroksitirozola, tirozola, kafeinske kiseline, p-kumarinske kiseline i brojne druge (Lee i Lee, 2010).



Slika 1. Izgled biljki korištenih za ekstrakciju (a - kadulja, b – timijan, c – majčina dušica, d – ružmarin, e – mravinac, f – maslina)

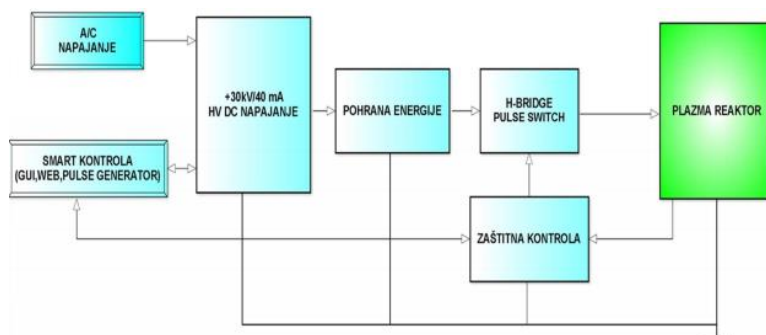
2.5. Ekstraktor

U eksperimentalnom dijelu rada koristit će se "plazma generator IMP-SSPG-1200" (Impel group, Zagreb, Hrvatska) koji služi za sofisticirane znanstvene primjene. Tehnički parametri uključuju podesivost DC napona u području 1kV do 30kV, podesivost maksimalne DC struja 40 mA pri 30kV, TCP/IP sa web serverom za daljinsko upravljanje i parametriziranje, napajanje 230 VAC jedna faza, 50Hz - ambijentalnu temperature od 5° C do 40° C , ambijentalnu vlažnost od 10% do 90% te forsirano zračno hlađenje. Plazma sustav se sastoji od upravljačke kontrole (GUI, WEB, generator impulsa, procesni kontroler), pretvorbe AC napona u visoki DC napon sa pohranom energije, H-most pretvarača DC napona u pravokutne impulse, zaštitne kontrole visokog napona i plazma reaktora.



Slika 2. Prikaz "plazma generator IMP-SSPG-1200"

Upravljačka kontrola služi za nadgledanje i parametriziranje cijelog sustava te ona prima komande preko tipkovnice ili vanjskog računala te ih pretvara u fizikalne veličine.



Slika 3. Blok dijagram "plazma generator IMP-SSPG-1200"

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

- Biljni materijal su osušeni i usitnjeni listovi majčine dušice (Franck, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Reagensi

- otapalo: destilirana voda
- otapalo: etanol:voda
- 30%-tna vodena otopina etanola
- Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens)
- standardna otopina ružmarinske kiseline
 - U tikvici volumena 100 mL otopi se 50 mg ružmarinske kiseline u 30%-tnoj vodenoj otopini etanola te se istom otopinom nadopuni do oznake.
- zasićena otopina natrijeva karbonata (m/v), Na_2CO_3
 - U 800 mL vruće destilirane vode otopi se 200 g anhidrida natrijeva karbonata, u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL, a zatim ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, te se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina treba odstajati 24 sata te se nakon toga profiltrira.

3.1.3. Uređaji i pribor

- generator (IMP-SSPG-1200)
- Buchnerov lijevak
- odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL
- mikropipeta
- pipete, volumena 25 mL, 20 mL, 5 mL, 2mL
- vodena kupelj
- kivete
- spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
- pH-metar (Pye Model 292, Pye Unicam)
- konduktometar (PTI-8 Digital Conductivity Meter)

3.2. Metode rada

3.2.1. Ekstrakcija

Priprema uzorka započinje vaganjem određene mase osušenog materijala, ovisno o broju pokusa, te se homogenizira s 50mL odgovarajućeg otapala. Homogena smjesa se ekstrahira u reaktoru u struji argona pri visokom naponu pri unaprijed određenim uvjetima (tablica 5). Dobiveni ekstrakt se filtrira preko Buchnerovog lijevka te se prikuplja u odgovarajuće posuđe te se analizira.

Tablica 5. Parametri tretiranja uzoraka majčine dušice

	masa uzorka g	frekvencija Hz	vrijeme min	udio etanola %	napon kV
MA2	5	150	9	50	5
MA5	5	50	3	0	25
MA7	5	100	6	25	15
MA10	3	100	6	25	15
MA14	5	150	3	50	25
MA16	1	100	6	25	15
MA18	1	100	9	75	15
MA21	1	0	6	25	15
MA24	1	100	6	25	15
MA32	3	150	9	50	25

Oznaka „MA“ označava uzorak majčine dušice, a broj koji slijedi definira parametre pokusa koji su navedeni u tablici 5.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja ukupnih fenola se temelji na kolornoj reakciji koja je posljedica reakcije fenola s Folin–Ciocalteu-ovim reagensom te je primjenom spektrofotometrijske metode mjeren intenzitet nastalog obojenja pri 760 nm (Ough i Amerine, 1998). Folin–Ciocalteu reagens je smjesa fosfotungstične i fosfomolibdenične kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojani.

Postupak

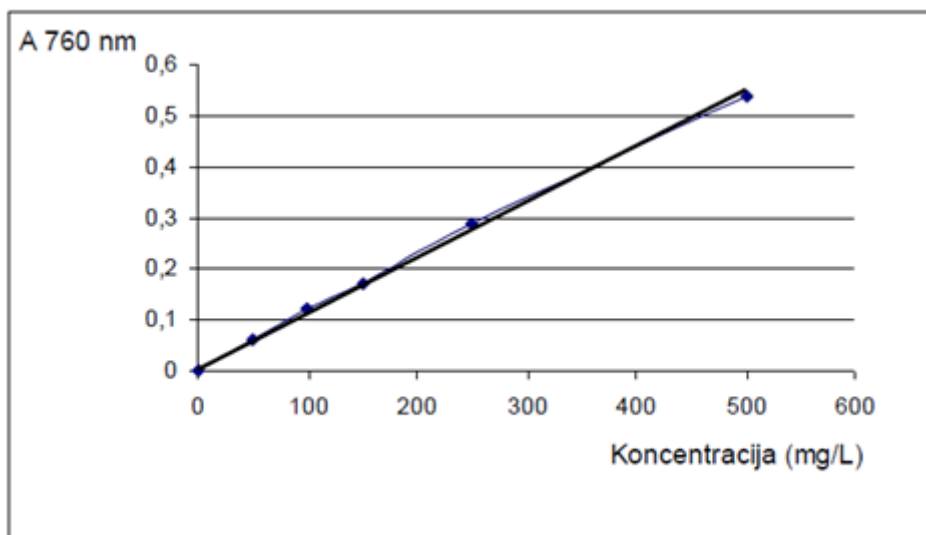
U odmjernu tikvicu volumena 25 mL otpipetira se redom: 250 μ L uzorka (prethodno razrijeđenog otapalom u omjeru 1:9), 15 mL destilirane vode, 1,25 mL FC reagensa (FC

reagens miješa se s destiliranom vodom u omjeru 1:2 neposredno prije mjerenja), nakon 3 minute 3,75 mL zasićene otopine natrijevog karbonata te se uzorci nadopune odgovarajućim otapalom do oznake. Tako pripremljeni uzorci stavljaju se u vodenu kupelj na termostatiranje pri 50°C, 30 minuta. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta stavi 250 µL otapala. Nakon termostatiranja, uzorci se ohlade pod vodom, te se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 760 nm.

Izrada baždarnog pravca

Iz pripremljene otopine galne kiseline (500 mg/L) rade se razrijeđenja, u odmjernim tikvicama volumena 10 mL, tako da koncentracije galne kiseline iznose: 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L. Razrijeđenja se prirede tako što se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom doda: 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL otopine ružmarinske kiseline i nadopuni 30%-tnom vodenom otopinom etanola do oznake. Iz svake tikvice se otpipetira 250 µL uzorka u odmjerne tikvice volumena 25 mL te se postupa po propisu za određivanje ukupnih fenola. Baždarni pravac se nacrtava pomoću programa Microsoft Excel na računalu pri čemu se na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu vrijednosti apsorbancija mjerene pri 760 nm.

Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Excel.



Slika 4. Baždarni pravac galne kiseline

$$y=0,0011x$$

$$R^2=0,991$$

y-apsorbancija na 760 nm

x-koncentracija galne kiseline (mg/L)

R²-koeficijent determinacije

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti

Određivanje pH vrijednosti nakon tretmana vrši se očitavanjem na pH – metru (pH METER, Pye Model 292, Pye Unicam) tako da se kalomel elektroda uroni u uzorak i u njoj drži 5 minuta nakon čega se očitava pH - vrijednost.

3.2.4. Određivanje elektroprovodljivosti

Određivanje elektroprovodljivosti prije i nakon tretmana vrši se očitavanjem na konduktometru (PTI-8 Digital Conductivity Meter, Scientific Industries International Inc., UK). Instrument je kalibriran prije mjerenja sa kemikalijama kojima je poznata elektroprovodljivost

4. REZULTATI I RASPRAVA

Fenolni spojevi su prepoznati po svojoj biološkoj aktivnosti zbog koje imaju važnu ulogu u očuvanju zdravlja organizma jer djeluju kao antioksidansi te hvatači slobodnih radikala. Upravo zbog tih vrijednosti koje nose, poželjno ih je izdvojiti u što većim količinama. Konvencionalne metode ekstrakcija troše puno organskih otapala i velike količine energije što ne čini sustav održivim. Upoznati s tim problemima, znanstvenici istražuju metode i otapala su u skladu s principima zelene kemije (Chemat i sur., 2012). U ovom eksperimentalnom radu kao zelena otapala korištena su voda i etanol, te ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem kao alternativni postupak ekstrakcije.

U sklopu projekta "*Greenvoltex*", otapala koja su se u ovom radu koristila su voda, 25% vodena otopina etanola, 50% vodena otopina etanola i 75% vodena otopina etanola. Fenolni spojevi su polarni spojevi te su navedena otapala zbog svoje izrazite polarnosti pogodna za njihovu ekstrakciju vodeći se principom "*slično otapa slično*". U sljedećim tablicama prikazani su rezultati mjerenja provodnosti, pH, temperature te ukupnih fenola nakon izvršenih ekstrakcija (tablice 6 i 7).

Tablica 6. Rezultati mjerenja kod netretiranih uzoraka majčine dušice

UZORA K	Provodno st μS/cm	pH	Temperatu ra °C	Ukup ni fenoli mg GAE / g uzork a	UZORA K	Provodno st μS/cm	pH	Temperatu ra °C	Ukup ni fenoli mg GAE / g uzork a
3 NM0/1	621	5,9 1	20,6	6,87	6 NM25/ 5	809	6,0 6	20,5	18,62
3 NM0/3	1529	5,8 8	21,1	7,54	9 NM25/ 1	283,7	6,0 3	20,9	22,47
3 NM0/5	2500	5,9 4	21,1	12,59	9 NM25/ 3	595	6,0 8	20,2	43,94
6 NM0/1	625	5,7 4	20,8	17,97	9 NM25/ 5	706	5,9 6	20,6	18,44

6 NM0/3	1558	5,7 4	20,0	5,99	3 NM50/ 1	133,8	6,2 8	20,2	1,47
6 NM0/5	2394	5,6 4	20,7	21,23	3 NM50/ 3	270	6,3 0	21,5	9,04
9 NM0/1	560	5,7 7	20,6	23,07	3 NM50/ 5	418	6,0 8	20,3	11,75
9 NM0/3	1508	6,3 5	21	19,69	6 NM50/ 1	122,2	6,3 6	20,4	3,27
9 NM0/5	2348	5,8 0	20,2	21,32	6 NM50/ 3	342	6,2 3	20,6	17,84
3 NM25/ 1	319	6,0 6	20,9	10,6	6 NM50/ 5	447	6,0 4	20,2	16,52
3 NM25/ 3	402	6,0 2	20,5	11,24	9 NM50/ 1	121,8	6,2 8	20,4	11,07
3 NM25/ 5	863	5,9 4	20,5	15,56	9 NM50/ 3	316	6,2 3	21,7	13,89
6 NM25/ 1	358	6,2 1	22,4	7,32	9 NM50/ 5	442	6,0 9	20,6	17,93
6 NM25/ 3	565	6,0 1	22	14,29					

Prvi broj oznake uzorka označava vrijeme tretiranja koje može biti 3, 6 ili 9 minuta. Kratica „N” označava netretirane uzorke, „M” označava uzorke majčine dušice, a broj nakon „M” udio etanola u vodi koji može biti 0% (sama voda), 25% ili 50% vodena otopina etanola. Broj na kraju oznake označava odvagu samog uzorka te ona iznosi 1, 3 ili 5 grama.

Tablica 7. Rezultati mjerenja nakon tretiranja uzoraka majčine dušice

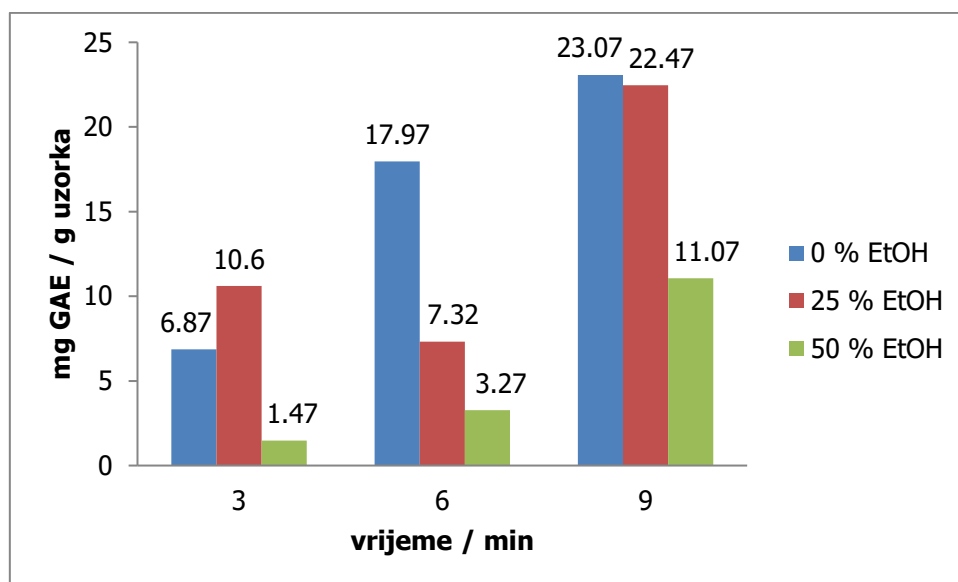
UZOR AK	Provodn ost μS/cm	pH	Temperat ura °C	Ukup ni fenoli mg GAE / g uzork a	UZOR AK	Provodn ost μS/cm	pH	Temperat ura °C	Ukup ni fenoli mg GAE / g uzork a
MA2	542	6,1 7	22,5	27,47	MA16	287,2	6,2 3	22,8	12,87
MA5	2419	5,8 4	21,3	28,58	MA18	39,8	6,7	23,1	17,37
MA7	1090	5,9 8	22,3	23,96	MA21	265,2	6,1 5	23,3	18,72
MA10	708	6,1 1	22,5	15,74	MA24	275,8	6,0 9	23,4	26,82
MA14	497	6,1 4	24,3	26,73	MA32	348	6,2 8	27,7	32,04

Usporedbom rezultata mjerenja provodnosti, pH vrijednosti i temperature nakon provedenih ekstrakcija, moguće je primjetiti određene karakteristike ponašanja uzoraka. Većim udjelom etanola u vodenoj otopini, provodnost ekstrakta se smanjuje. To se svojstvo pripisuje tome što je poznato da etanol nije elektrolit, ali budući da se nalazi u vodenoj otopini može se očitati provodnost. Također, tretirani uzorci pokazuju nešto nižu provodnost u odnosu na netretirane. Razlog tomu je utjecaj plazme. Intenziteti emisije OH skupine i atoma kisika (O) smanjuju se s povećanjem provodljivosti. Ako je plazma nastala zbog raspadanja, pojavi se trenutni impuls i napon će se smanjiti kroz vrijeme. Hipotetizira se da je uzrokovano mehanizmom nastajanja plazme u vodi (Ihara i sur., 2018).

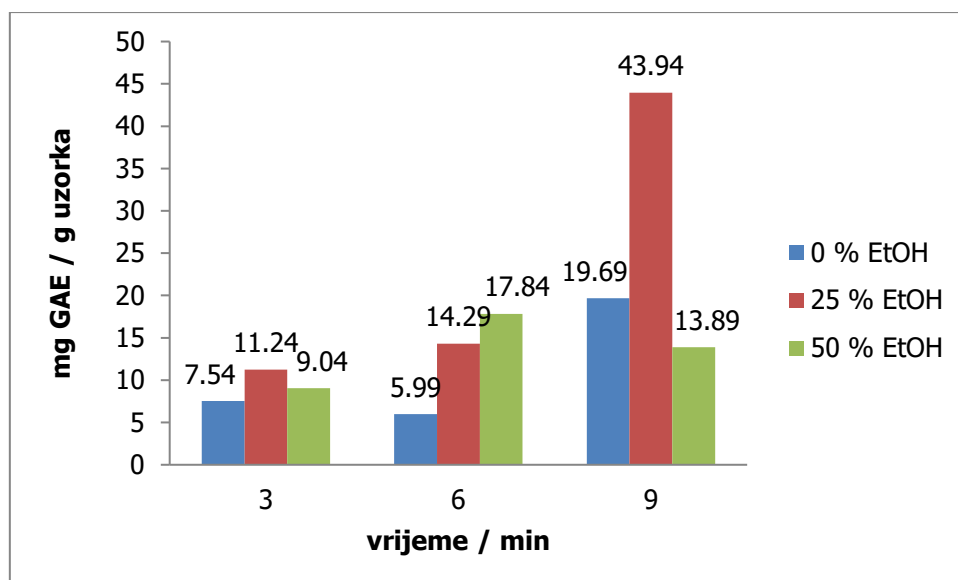
Tretirani uzorci pokazuju i više pH vrijednosti u odnosu na netretirane uzorke. Fenoli su spojevi s hidroksilnom skupinom koja je bazičnog karaktera, te ona povišuje pH vrijednost otopine. Budući da se u tretiranim uzorcima nalazi više fenolnih spojeva, pH vrijednost je također viša.

Utjecaj temperature također je važan jer povišenjem temperature može doći do ugrožavanja strukture biljke i uništavanja biološki aktivnih komponenti koje je potrebno ekstrahirati. Primjećuje se da tretiranjem uzoraka ne dolazi do značajnijeg povišenja temperature u odnosu na netretirane uzorke.

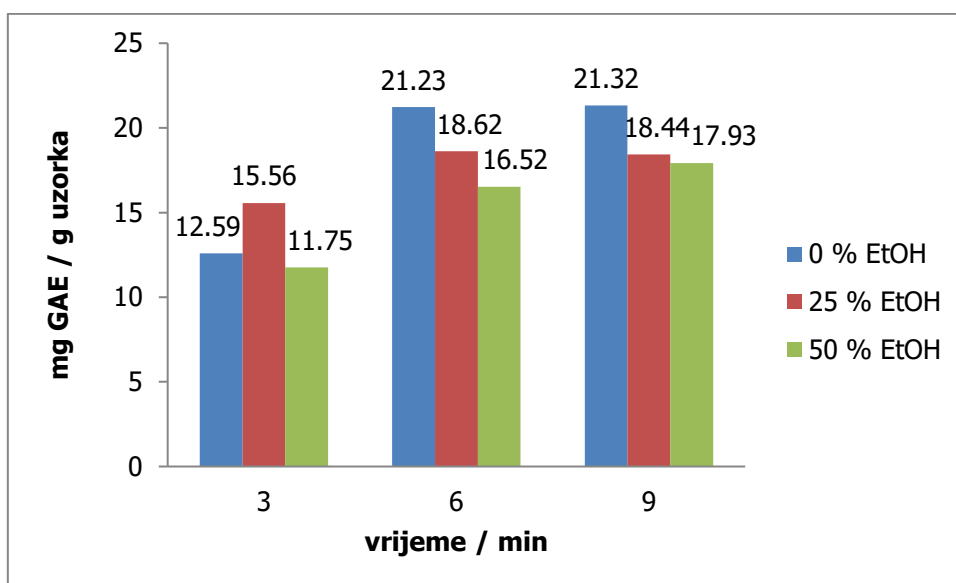
U grafovima koji slijede, prikazane su dobivene masene koncentracije ukupnih fenola u netretiranim uzorcima majčine dušice (slike 5, 6, 7), te u tretiranim uzorcima majčine dušice (slike 8, 9, 10) i na kraju usporedbe tretiranih i netretiranih uzoraka.



Slika 5. Masena koncentracija ukupnih fenola u 1 gramu netretirane majčine dušice



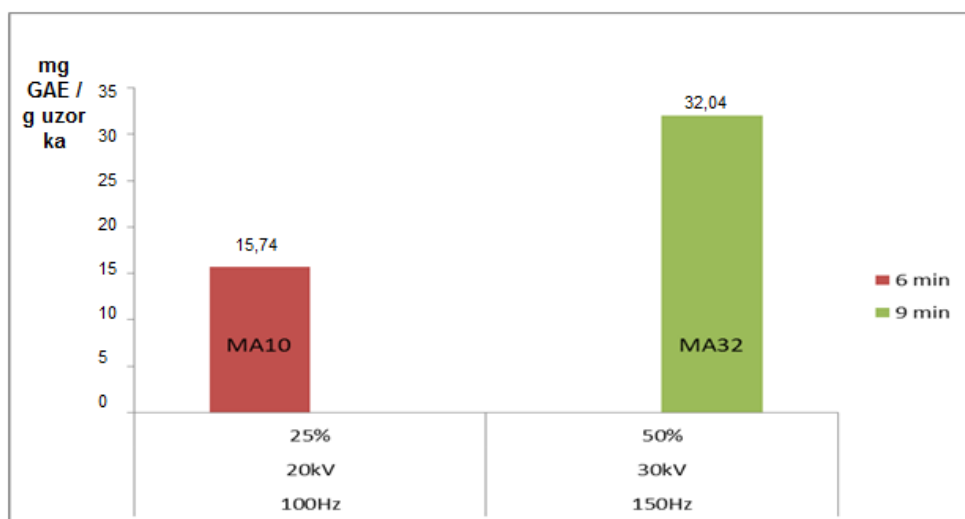
Slika 6. Masena koncentracija ukupnih fenola u 3 grama netretirane majčine dušice



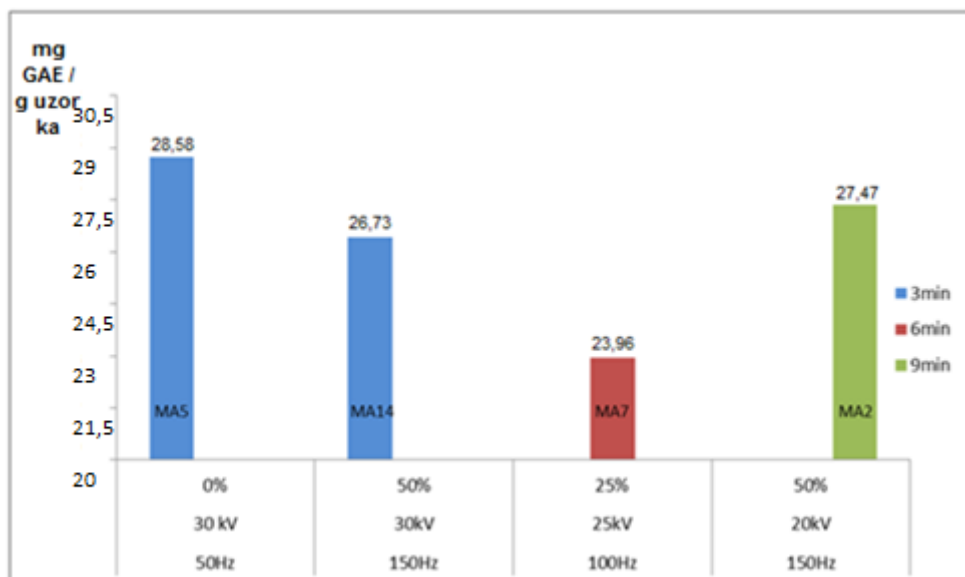
Slika 7. Masena koncentracija ukupnih fenola u 5 grama netretirane majčine dušice



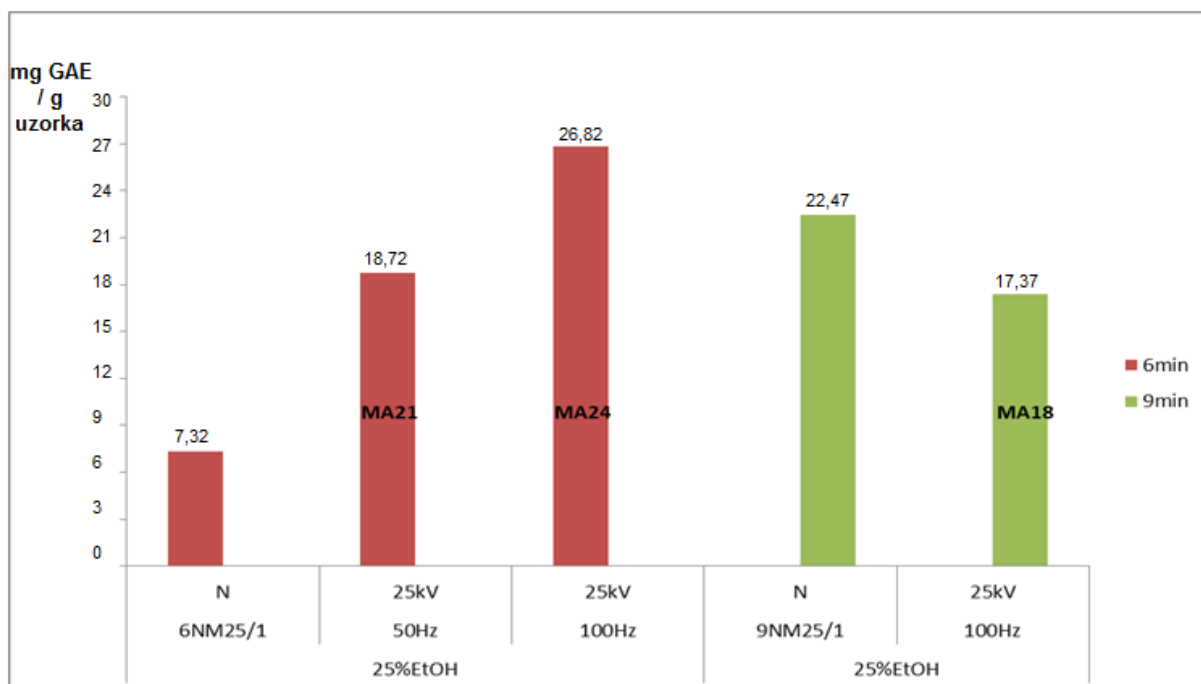
Slika 8. Masena koncentracija ukupnih fenola u 1 gramu tretirane majčine dušice



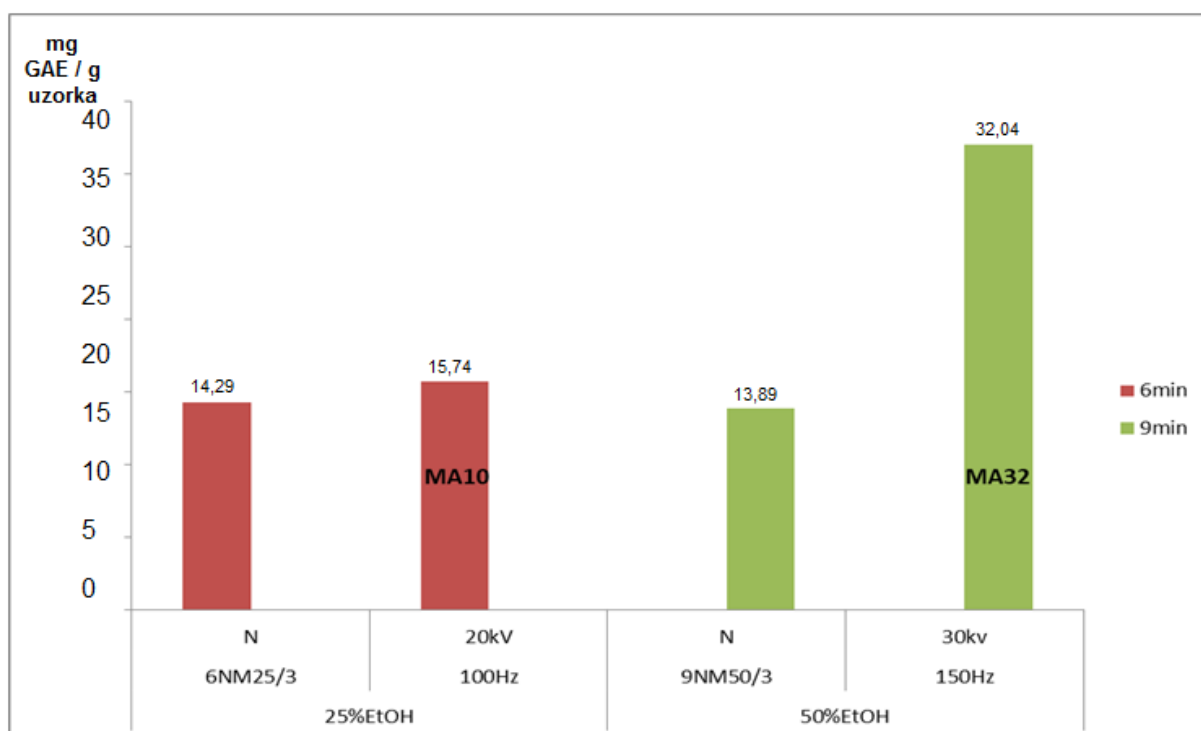
Slika 9. Masena koncentracija ukupnih fenola u 3 grama tretirane majčine dušice



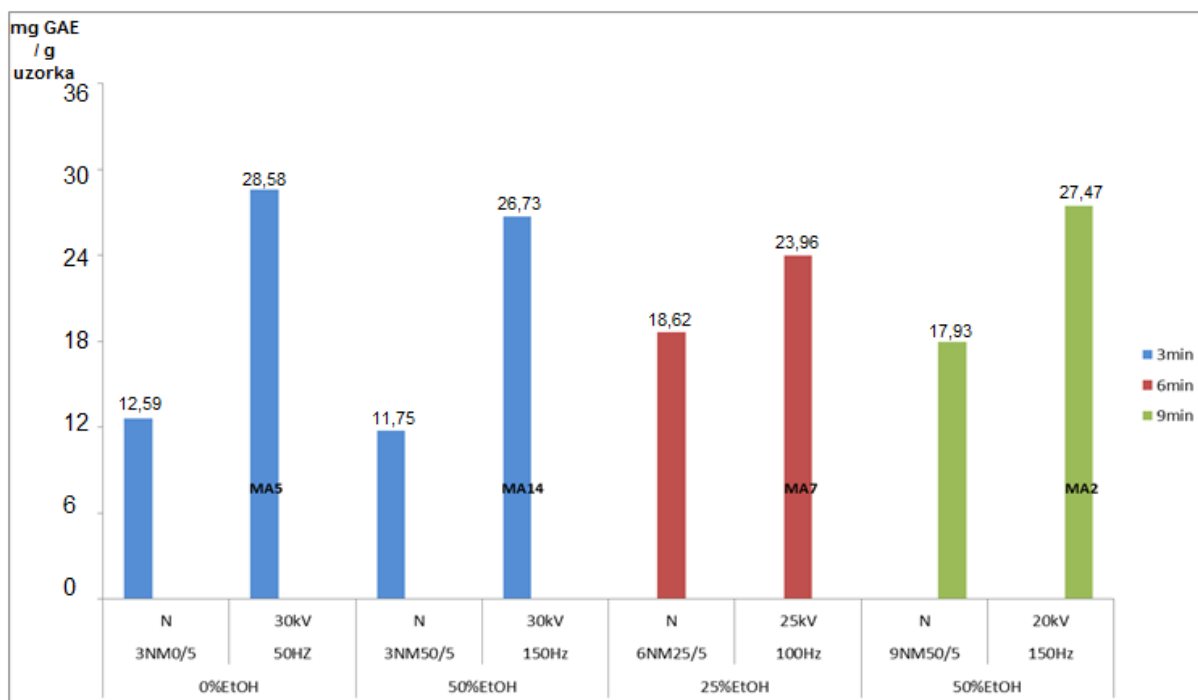
Slika 10. Masena koncentracija ukupnih fenola u 5 grama tretirane majčine dušice



Slika 11. Usporedba ukupnih fenola majčine dušice odvaga od 1 g netretiranih i tretiranih uzoraka



Slika 12. Usporedba ukupnih fenola majčine dušice odvaga od 3 g netretiranih i tretiranih uzoraka



Slika 13. Usporedba ukupnih fenola majčine dušice odvaga od 5 g netretiranih i tretiranih uzoraka

Uspoređujući prinos ekstrakcije ukupnih fenola između tretiranih i netretiranih uzoraka, zamjećuje se povećana količina ekstrahiranih ukupnih fenola u korist tretiranih uzoraka, što je i u skladu s očekivanjima budući da se kao metoda koristilo visokonaponsko pražnjenje koje stvara pulsirajuće električno polje, te stvaranje pora u membranama stanica iz kojih je tada lakši pristup otapala fenolima te bolje difuzija, odnosno izmjena tvari (Fincan i sur., 2004).

U većini slučajeva, duljim vremenom ekstrakcije dobiva se veća količina fenolnih spojeva. Ali, može se primjetiti da duljim vremenom ekstrakcije nije svaki put zagarantiran i očekivani veći prinos fenolnih spojeva. To se može pripisati produktima djelovanja plazme u vodi što su hidroksilni radikal i vodikov peroksid koji su vrlo reaktivni. (Boussetta i Vorobiev, 2014). Budući da fenoli imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, oni će donirati svoj proton i na taj način ih neutralizirati. Zato u uzorcima koji su tretirani duže vrijeme ponekad ima manje ukupnih fenola, nego što je očekivano.

Primjenjene vrijednosti frekvencije i napona imaju izrazit utjecaj na ekstrakciju fenolnih spojeva. Pokazano je da se dezintegracija stanica postupno povećava povećanjem frekvencije i napona, i zbog toga se dobiva veća količina fenola (slika 8). Ali, povećanje

frekvencije i napona pozitivno djeluje samo do određene granice. Za sve te spojeve postoji i optimalan unos energije za ekstrakciju. Oksidacijske kemijske reakcije koje se javljaju mogu oštetiti ekstrahirane polifenole. Konkretno, primjenom visokog napona, količina proizvedenih oksidacijskih vrsta je povećana i može oksidirati polifenole i smanjiti njihovu koncentraciju (Boussetta i Vorobiev, 2014). Primjer navedene pojave primjećuje se na slici 11. Ekstrakt tretiranog uzorka sadrži manju koncentraciju fenola (17,37 mg GAE/g uzorka) u odnosu na netretirani uzorak (22,47 mg GAE/g uzorka). Pošto su oba uzorka odvage 1 g, te je u oba slučaja upotrijebljena 25% otopina etanola, utjecaj frekvencije od 100Hz i napona od 25kV bio je prejak te je zato niža koncentracija fenola u ekstraktu tretiranog uzorka.

Jedan od najbitnijih faktora uspješnosti ekstrakcije bioaktivnih komponenti je odabir otapala. Budući da su voda i etanol izrazito polarni, imaju dobro svojstvo ekstrakcije polifenola. U većini provedenih eksperimenata, ekstrakcija vodom pokazala se uspješnijom od ekstrakcije ostalim otapalima jer je sama voda polarnija od etanola (slike 5, 7, 10, 13). Međutim, manipuliranjem utjecaja frekvencije i napona, ponekad su dobivene veće koncentracije fenola otopinama etanola nego primjenom vode. Najuspješnijim pokusom (MA32) ekstrahirano je 32,04 mg GAE/g uzorka majčine dušice uz primjenu frekvencije od 150Hz te napona 30kV te 50% vodenom otopinom etanola (slika 12). Gledajući ostale eksperimente, zamjećuje se slabo djelovanje 75% otopine etanola (MA16, slika 8), a uspješnost ekstrakcije vodom, 25% otopinom etanola i 50% otopinom etanola izmjenjuje se ovisno o primjenjenim parametrima kao što su vrijeme tretiranja, napon i frekvencija.

Uspoređujući koncentraciju ukupnih fenola dobivenu iz odvaga od 1g, 3g i 5g može se primijetiti da u tretiranim uzorcima nema većih razlika u koncentraciji ekstrahiranih fenola. Iz 1g uzorka MA24 dobilo se 26,82 mg GAE/g uzorka (slika 11), iz već spomenutih 3g uzorka MA32 dobilo se 32,04 mg GAE/g uzorka (slika 12), te iz 5g uzorka MA14 26,73 mg GAE/g uzorka majčine dušice (slika 13). Mogući razlozi tomu su nedovoljna količina otapala u odnosu na veće vrijednosti odvaga, i zbog toga, mala dodirna površina izmjene tvari biljnog materijala i otapala.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće :

1. Tretiranjem visokonaponskim pražnjenjem uspješno je provedena ekstrakcija fenolnih spojeva iz majčine dušice.
2. Voda i etanol pokazali su se prikladnim otapalima koja su u skladu sa principima zelene kemije.
3. Optimizacijom parametara primjenjenog napona i frekvencije može se utjecati na uspješnost ekstrakcije i prinos fenolnih spojeva.
4. Najveći prinos ekstrakcije postignut je upotrebom 50% vodene otopine etanola, napona 30kV i frekvencije 150Hz.
5. U većem broju eksperimenata voda se pokazala kao prikladnije otapalo s većim prinosom koncentracije fenolnih spojeva.

6. LITERATURA

Anastas P., Eghbali N. (2010) Green Chemistry: Principles and practice. Chemical Society Reviews 39: str. 301–312.

Anastas, P., Warner, J. (1998) Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press: New York, str. 30.

Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croatian Journal of Food Science and Technology 3 (1) str. 32-47.

Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. C. R. Chim., 17, 197 – 203.

Chemat, F., Filly, A., Fabiano-Tixier, A., Louis, C., Fernandez, X. (2016) Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers Comptes Rendus Chimie

Chemat, F., Vian M., Cravotto, G. (2012) Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles: International Journal of Molecular Sciences, 13(7): 8615–8627.

Cvjetko Bubalo M., Radošević K., Radojčić Redovniković I., Halambek J., Vorkapić-Furač J., Gaurina Srček V. (2014) Ionske kapljewine – razvoj i izazovi industrijske primjene Kem. Ind. 63 (5-6) 163–171

Destandau, E., Michel, T., Elfakir, C. (2013) Microwave - assisted Extractiona, U: Natural Product Extraction: Principles and Applications (Rostagno M.A., Prado, J.M., ured.), The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, str. 113-135

Dragović-Uzelac, V. (2017) Odabrane vrste začinskog i aromatskog bilja.

Fincan, M., De Vito, F., Dejmek, P. (2004) Pulsed electric field treatment for solid–liquid extraction of red beetroot pigment. Journal of Food Engineering 64(3):381-388

Fu, Y., Zu, Y., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. (2007) Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination Phytother. Res. 21, 989–994

Gasanova, S. (2013) Aqueous-phase electrical discharges: generation, investigation and application for organics removal from water. Dissertation. Universität Duisburg-Essen

Ihara, S., Sakai, T., Yoshida, Y., Nishiyama, H. (2018) Fundamental characteristics of discharge plasma generated in a water cavitation field. Journal of Electrostatics 93 110–117

Janiak, C. (2013) Ionic Liquids for the Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Zeitschrift für Naturforschung B: Journal of Chemical Science* 68b: 1059–1089.

Kudlak, B., Owczarek, K., Nemieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents – a review. *Environmental Science Pollution Research* 22: 11975–11992.

Kulišić, T., Radonić, A., Katalinić, V., Miloš, M. (2004) Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil *Food Chemistry* 85 633–640

Lovrić, T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*, Hinus, Zagreb

Lee, O. H., Lee, B. Y. (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract *Bioresource Technology* 101 3751–3754

Mason, T., Vintoru, M. (2011) The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves *Current Organic Chemistry*

Mirković, M. (2016) Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom u izolaciji polifenolnih spojeva iz korijena i lista maslačika

Paiva, P., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2: 1063–1071.

Sugiarto, A.T., Sato, M. (2001) Pulsed plasma processing of organic compounds in aqueous solution. *Thin Solid Films* 386 295-299

Tanzi, C., Vian, M., Ginies, C., Elmaatoui, M., Chemat, F. (2012) Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae. *Molecules* , 17, 8196-8205

Wong, L., Weller, C.L. (2006) Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends Food Science Technology* 17, 300.

Zhao, M. (2006), Innovative applications of ionic liquids as “green” engineering liquids. *Chemical Engineering Communications* 193: 1660-1677.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Monika Glušnović

ime i prezime studenta